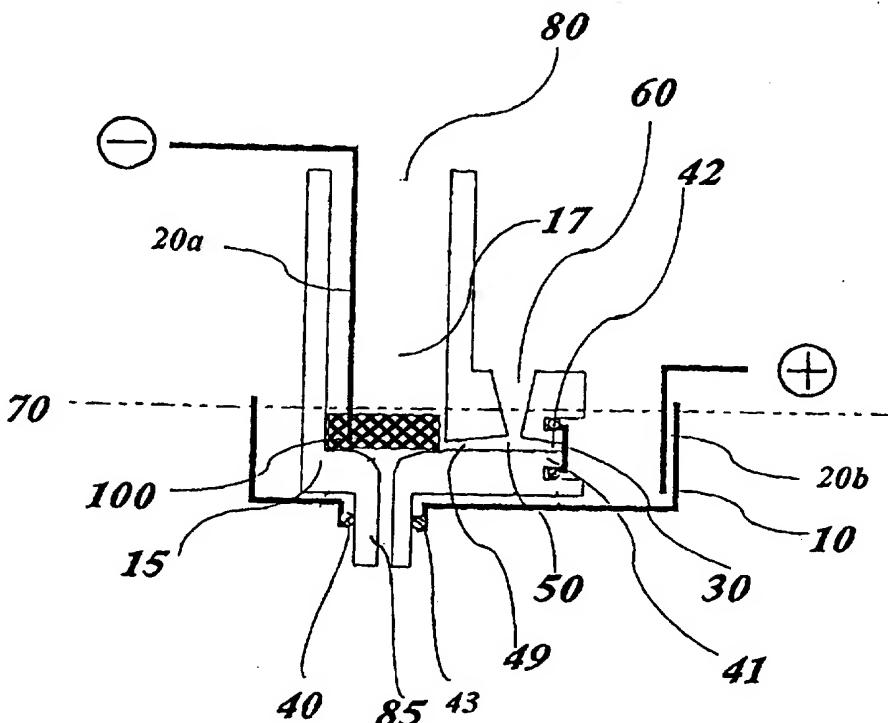




(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07H 1/08, C12Q 1/68, C12N 15/10, C12M 1/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/34908 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. September 1997 (25.09.97)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00517</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 14. März 1997 (14.03.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 10 354.1 15. März 1996 (15.03.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): INNOVA GESELLSCHAFT ZUR ENTWICKLUNG UND VERMARKTUNG INNOVATIVER PRODUKTE MBH [DE/DE]; Rebhuhnstrasse 15, D-68307 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LANGE, Hans [DE/DE]; Römerstrasse 99 D, D-68623 Lampertheim (DE).</p> <p>(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Bissel Salleck & Partner, Nürnberger Strasse 71, D-91052 Erlangen (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates a device for isolating nucleic acids from biological fluids and suspensions which contain nucleic acids. In the device, a reaction chamber (17) containing an adsorbent (100) is connected to a discharge chamber (50) and the nucleic acids can, by means of an electrophoresis device (20a, 20b), be transferred from the reaction chamber (17) to the discharge chamber (50) and concentrated.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei ein Reaktionsraum (17) zur Aufnahme eines Adsorptionsmittels (100) mit einem Entnahmerraum (50) verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren vom Reaktionsraum (17) in den Entnahmerraum (50) mittels einer Elektrophoresevorrichtung (20a, 20b) beweg- und anreicherbar sind.</p>			



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur
5 Isolierung von Nukleinsäuren.

Vor der Analyse von aus Zellen gewonnenen Nukleinsäuren mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es erforderlich, die Nukleinsäuren aufzureinigen und aufzukonzentrieren.

10 Ferner kann es notwendig sein, aus der zu analysierenden Probe bestimmte die Polymerasekettenreaktion störende Substanzen, wie die prosthetische Gruppe von Hämoglobin, von der Probe abzutrennen.

15 Daneben spielt auch bei anderen Techniken zur Analyse von Nukleinsäuren, bsp. der Hybridisierung, eine Aufreinigung und Aufkonzentration der zu analysierenden Nukleinsäuren eine wichtige Rolle.

20 Aus "Methods of Enzymology", Vol. 68, S. 170 - 182, ist es bekannt, zur Isolierung von Nukleinsäuren sog. "Spin-columns" zu verwenden. Dabei werden in einer aus der DE 41 39 664 A1 bekannten Variante folgende Arbeitsschritte verwendet:

- 25 aa) Zellaufschluß,
bb) Adsorption der Nukleinsäuren an einem Glasfaservlies in Gegenwart eines Puffers mit hoher Ionenstärke und
cc) Elution der Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer Ionenstärke.

30

Beim Schritt lit.aa) wird die flüssige Probe durch ein Glasfaservlies geleitet, an dem die Nukleinsäuren adsorbieren. Anschließend wird das Glasfaservlies mit

verschiedenen Lösungen gewaschen. Schließlich werden die Nukleinsäuren in Anwesenheit von Puffern geringer Ionenstärke von der Festphase eluiert.

5 Das bekannte Verfahren ist in mehrfacher Hinsicht nachteilig: Beim Waschen der Festphase kann es zur Kontamination der Probe kommen. Außerdem können wegen der im Glasfaservlies herrschenden Kapillarkräfte die Nukleinsäuren nur zum Teil daraus zurückgewonnen werden.

10 Des weiteren sind aus "Methods in Enzymology 65" (1980), S. 371 - 380 gelelektrophoretische Methoden bekannt, bei denen Nukleinsäuren an Gele gebunden und danach mittels Elektroelution wieder in Lösung gebracht werden. Auch dabei kann es zu Kontamination der Lösung kommen. Die Nukleinsäuren liegen in der Lösung in hoher Verdünnung vor. Eine Aufkonzentration findet nicht statt.

20 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung anzugeben, mit denen die Nachteile des Stands der Technik vermieden werden. Insbesondere soll ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren angegeben werden, die eine einfache und kostengünstige Aufreinigung und Aufkonzentration von Nukleinsäuren ermöglichen. Außerdem soll eine weitgehend automatisierte Isolation und Aufkonzentration von Nukleinsäuren durchführbar sein. Schließlich bezweckt die Erfindung die Vermeidung von Kontaminationen.

30 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 12 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen des Verfahrens bzw. der Vorrichtung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 11 sowie 13 bis 41.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen vorgesehen, wobei

5

- a) die Nukleinsäuren an ein Adsorptionsmittel gebunden werden,
- b) die Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel eluiert und
- 10 c) durch Elektrophorese von einem Reaktionsraum in einen damit verbundenen Entnahmeraum bewegt und dort angereichert werden.

15

Das Verfahren ermöglicht auf einfacherem Weg eine Aufreinigung und Aufkonzentration von Nukleinsäuren aus Flüssigkeiten. Insbesondere bei einer automatischen Verfahrensführung kann das Risiko einer Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden. Die Elution kann durch Pufferwechsel oder elektrisch 20 durch Elektroelution bzw. Elektrophorese erfolgen.

25

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen vorgesehen, wobei ein Reaktionsraum zur Aufnahme eines mit Nukleinsäuren beladenen Adsorptionsmittels mit einem Entnahmeraum verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren mittels einer Elektrophoreseeinrichtung vom Reaktions- in den Entnahmeraum bewegbar und dort anreicherbar sind. - Diese 30 Vorrichtung ermöglicht eine einfach und kostengünstig durchführbare Aufkonzentration und Isolierung von Nukleinsäuren. Durch das Vorsehen eines besonderen

Entnahmeraums kann eine Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand 5 der Zeichnung näher erläutert. Hier zeigen:

Fig. 1 eine schematische Querschnittsansicht eines ersten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,

10 Fig. 2 das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 mit "Spin-Column",

Fig. 3 eine schematische Querschnittsansicht eines zweiten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,

15 Fig. 4 eine schematische Querschnittsansicht durch ein erstes Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtung mit einer Vorrichtung gemäß Fig. 3,

20 Fig. 5 eine Draufsicht auf ein Agaroseflachbettgel,

Fig. 6a eine schematische Querschnittsansicht eines dritten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,

25 Fig. 6b eine Abwandlung des in Fig. 6a gezeigten Ausführungsbeispiels,

30 Fig. 6c eine schematische Querschnittsansicht eines vierten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,

Fig. 7a eine Untersicht eines fünften Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,

Fig. 7b eine Draufsicht auf das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 7a,

5 Fig. 7c eine schematische Seitenansicht des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 7a,

10 Fig. 7d eine perspektivische Ansicht eines Deckels für ein erstes Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung,

Fig. 7e eine perspektivische Ansicht des ersten Ausführungsbeispiels der Elutionsvorrichtung ohne Deckel,

15 Fig. 7f eine perspektivische Ansicht des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 7a bis 7c,

Fig. 8 eine schematische Querschnittsansicht durch ein sechstes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,

20 Fig. 9 eine schematische Querschnittsansicht durch eine beschichtete Elektrode,

25 Fig. 10 eine schematische Querschnittsansicht durch ein siebtes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,

Fig. 11 eine schematische Querschnittsansicht durch ein achtes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,

30 Fig. 12 eine Draufsicht auf ein zweites Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung und

35 Fig. 13 eine schematische Querschnittsansicht durch ein zweites Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtung.

In Fig. 1 ist ein schematischer Querschnitt eines ersten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung gezeigt. In einem Elektrophoresepuffertank 10 mit einem bodenseitigen Durchbruch 43 ist ein Behälter 15 aufgenommen. Der Behälter 15 umschließt einen Reaktionsraum 17, welcher über einen Kanal 49 mit einem Entnahmeraum 50 verbunden ist. Das Volumen des Reaktionsraums 17 beträgt vorzugsweise 1 bis 20 ml. Der Entnahmeraum 50 ist mittels einer eine erste Öffnung 42 verschließenden ersten permeablen Membran 30 ionenleitend mit einem im Elektrophoresepuffertank 10 aufgenommenen Elektrophoresepuffer verbunden. Das Volumen des Entnahmeraums 50 beträgt vorzugsweise 0,005 bis 0,1 ml. Die erste permeable Membran 30 ist z.B. aus einer Dialysemembran gebildet, welche für Nukleinsäuren nicht durchlässig, für Salze, insbesondere chaotrope Salze, jedoch durchlässig ist. Die erste permeable Membran 30 ist mittels eines flexiblen Rings, bsp. eines O-Rings, auf einem ersten Stutzen 41 befestigt. Im Reaktionsraum 17 ist ein Adsorptionsmittel 100, bsp. ein Glasfaservlies, Silika, Glasperlen, mit Glas umfangene magnetische Partikel, Anionenaustauscher o. dgl., aufgenommen. In den Reaktionsraum 17 ragt durch eine zweite Öffnung 80 eine Kathode 20a. Eine Anode 20b taucht in den im Elektrophoresepuffertank 10 befindlichen Elektrophoresepuffer ein, dessen Füllstand mit 70 bezeichnet ist. Unterhalb des Adsorptionsmittels 100 erstreckt sich vom Behälter 15 ein zweiter Stutzen 85, der den Durchbruch 43 durchgreift. Der zweite Stutzen 85 ist mittels eines O-Rings 40 gegenüber dem Elektrophoresepuffertank 10 abgedichtet. - Der Entnahmeraum 50 weist eine Entnahmöffnung 60 auf. Er ist so ausgebildet, daß Lufteinschlüsse vermieden werden. Der Entnahmeraum 50 kann insbesondere als Kapillare ausgebildet sein.

Fig. 2 zeigt im wesentlichen das in Fig. 1 gezeigte erste Ausführungsbeispiel. Dabei ist im Reaktionsraum 17 ein "Spin-

column" 90 aufgenommen. Ein den Elektrophoresepuffertank 10 durchgreifender zweiter Stutzen 85 ist hier nicht vorgesehen.

In Fig. 3 ist eine schematische Querschnittsansicht durch ein
5 zweites Ausführungsbeispiel der Vorrichtung gezeigt. Dabei befindet sich die Kathode 20a außerhalb des Reaktionsraums 17. Sie taucht direkt in den Elektrophoresepuffertank 10 ein. Am den Reaktionsraum 17 umgreifenden Teil des Behälters 15 ist ein dritter Stutzen 45 vorgesehen, dessen dritte Öffnung
10 46 durch eine zweite permeable Membran 31 verschlossen ist.

Fig. 4 zeigt eine schematische Querschnittsansicht durch ein erstes Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtung mit der Vorrichtung gemäß Fig. 3.

15 Die Vorrichtung gemäß Fig. 3 befindet sich im Wirkbereich eines x, y, z-Pipettors, dessen x, y, z-Pipettierarm mit 190 bezeichnet ist. Der x, y, z-Pipettierarm 190 nimmt eine Pipettierspitze 180, vorzugsweise eine Wegwerfspitze, auf. Ein geeigneter x, y, z-Pipettor wird bsp. von der Firma TECAN
20 AG, Schweiz, angeboten. Ferner ist im Wirkbereich des x, y, z-Pipettors ein heizbarer Schüttelbock 170 angeordnet. Im Schüttelbock 170 sind Reaktionsrörchen 150 für die Lyse aufgenommen. Daneben befinden sich ein erstes Gefäß 160 für die Lyse, ein zweites Gefäß 162 zur Aufnahme für eine
25 Waschlösung sowie Probengefäße 165. Mit 185 ist ein Vorrat an Pipettenspitzen und mit 210 sind PCR-Gefäße bezeichnet.

Der Elektrophoresepuffertank 10 ist mit einem Füllstutzen 125 versehen, der mit einem Elektrophoresepuffervorrat 110 unter
30 Zwischenschaltung einer Pumpe 120 verbunden ist. Der zweite Stutzen 85 sowie eine am Boden des Elektrophoresepuffertanks 10 vorgesehene Ableitung 140 stehen mit einer zweiten Pumpe 130 in Verbindung. Die zweite Pumpe 130 ist vorzugsweise als Schlauchpumpe ausgeführt. Eine geeignete Schlauchpumpe wird
35 bsp. von der Firma Cavro, Kalifornien, USA, angeboten. Die

Kathode 20a sowie die Anode 20b sind über elektrische Zuleitungen 225a bzw. 225b mit einer Spannungsquelle 220 verbunden. Die erste 120 und die zweite Pumpe 130, der Schüttelbock 170, der x,y,z-Pipettor sowie die Spannungsquelle 220 sind so ausgeführt, daß sie mittels eines Prozeßrechners ansteuerbar sind. Somit ist ein vollautomatischer Betrieb der Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtung möglich.

- 10 In Fig. 5 ist eine Draufsicht auf eine besonders einfache Variante eines Behälters 15 gezeigt. Dieser ist aus einem Agaroseflachbettgel 11 hergestellt, an dessen gegenüberliegenden Querseiten die Kathode 20a und die Anode 20b anliegen. Im Agaroseflachbettgel 11 ist eine erste den Reaktionsraum 17 bildende Ausnehmung 81 zur Aufnahme von Adsorptionsmittel und eine zweite Ausnehmung 61 vorgesehen. Die zweite Ausnehmung 61 ist schlitzförmig ausgebildet. Sie dient zur Entnahme der darin angereicherten Nukleinsäuren.
- 15 20 In Fig. 6a ist eine schematische Querschnittsansicht durch ein drittes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung gezeigt. Dabei ist der Behälter 15 in Form eines Kreuzverbindungsstücks ausgebildet. Das Adsorptionsmittel 100 befindet sich auf einem Stützvlies 302. Die Kathode 20a und die Anode 20b sind als elektrisch leitfähige Kunststoffpipettenspitzen ausgebildet, die mit dem Elektrophoresepuffertank (hier nicht gezeigt) in Verbindung stehen. Sie sind mit dem Behälter 15 über Schlauchstücke 318 verbunden. Im Entnahmeraum 50 angereichte Nukleinsäuren können durch die Entnahmöffnung 60 abgezogen werden.
- 25 30

Wie in Fig. 6b gezeigt ist, können zwischen dem Entnahmeraum 50 sowie einem Zwischenraum 321 weitere Stützvliese 303 angeordnet sein. Bei dem in Fig. 6c gezeigten vierten Ausführungsbeispiel sind die Öffnungen der als

Kunststoffpipettenspitzen ausgebildeten Elektroden 20a bzw. 20b verschlossen.

In den Fig. 7a bis 7c ist ein fünftes Ausführungsbeispiel der
5 Vorrichtung in verschiedenen Ansichten gezeigt. Dabei besteht
der Behälter 15 aus einem quaderförmigen Teil. Der
Reaktionsraum 17 ist durch eine Bohrung gebildet. An beiden
Seiten sind neben dem Reaktionsraum 17 Ausnehmungen 320, 321
zur Aufnahme der Kathode 20a bzw. der Anode 20b vorgesehen.
10 Die Wand zwischen den Ausnehmungen 320, 321 und dem
Reaktionsraum 17 ist ionenleitend ausgebildet. Die
Ausnehmungen 320 dienen zur Aufnahme von
Elektrophoresepuffer. Sie sind mit Stopfen 340 verschlossen.
Der Elektrophoresepuffertank besteht bei dieser
15 Ausführungsform aus zwei Teilbehältern, welche den
Reaktionsraum 17 umgeben. Eine Mehrzahl derartiger
Vorrichtungen, von denen in Fig. 7f nochmals eine
perspektivisch gezeigt ist, können Bestandteile des in den
Fig. 7d und 7e gezeigten ersten Ausführungsbeispiels einer
20 Elutionsvorrichtung sein. Die Elutionsvorrichtung besteht im
wesentlichen aus einem Mehrfachbehälter 410 zur Aufnahme
mehrerer Vorrichtungen gemäß Fig. 7f. Der Mehrfachbehälter
410 weist einen Vakuumanschluß 401 sowie Anschlüsse 402 für
einen Flüssigkeitskreislauf zum Beheizen der
25 Elutionsvorrichtung auf. Ein in Fig. 7d gezeigter Deckel 400
ist mit Zuleitungen 226a, 226b für die Elektroden versehen.

In Fig. 8 ist ein sechstes Ausführungsbeispiel der
Vorrichtung gezeigt. Dabei ist die Kathode 20a in die Wand
30 des Reaktionsraums 17 und die Anode 20b in die
gegenüberliegende Wand des Entnahmeraums 50 integriert. Im
Entnahmeraum 50 ist eine permeable, insbesondere eine
semipermeable, Membran 310 vorgesehen, welche für
Nukleinsäuren undurchlässig ist. Die Membran 310 verhindert,
35 daß die Nukleinsäuren direkt an die Anode 20b gelangen und

dort durch Redoxprozesse zerstört werden. - Das Adsorptionsmittel 100 ist über ein Stützvlies 302 am Eingang des zweiten Stutzens 85 abgestützt.

5 Fig. 9 zeigt eine schematische Querschnittsansicht durch eine beschichtete Elektrode. Eine aus einem Edelmetall, wie Gold, Silber oder Platin, oder elektrisch leitfähigem Kunststoff hergestellte Kathode oder Anode 20a bzw. 20b ist mit einer aus mehreren Lagen bestehenden Beschichtung versehen. Eine
10 erste 323 auf das Edelmetall oder den Kunststoff aufgebrachte Lage besteht aus biotinyliertem Rinderserum Albumin, eine darauf auflagernde zweite Lage 325 besteht aus einem Streptavidin oder Polystreptavidin und eine äußere dritte Lage 324 ist aus einem Oligonukleotid gebildet.

15 Bei dem in Fig. 10 gezeigten siebten Ausführungsbeispiel der Vorrichtung ist ein beweglicher Permanentmagnet 312 an der Außenseite des Behälters 15 so angeordnet, daß sein Nordpol in der Nähe der Kathode 20a sich befindet. Der Reaktionsraum
20 17 ist mit einem durchsichtigen Schnappdeckel 316 verschlossen. Der Entnahmeraum 50 ist mit einem Schnappdeckel 326 verschlossen, der mit einem Septum 328 versehen ist. Das Septum 328 kann zur Entnahme bzw. zur Zugabe von Flüssigkeit mittels einer Nadel 327 durchstochen werden. So kann eine
25 Kontamination der in der Vorrichtung befindlichen Flüssigkeit vermieden werden. Mit 314 ist ein Photomultiplier bezeichnet, der oberhalb des durchsichtigen Schnappdeckels 316 angeordnet ist.

30 In Fig. 11 ist ein schematischer Querschnitt eines achten Ausführungsbeispiels gezeigt. Im Gegensatz zum siebten Ausführungsbeispiel ist hier der bewegliche Permanentmagnet 312 mit seinem Südpol in der Nähe der Außenseite der Anode 20b angeordnet. Der Boden des Entnahmeraums 50 ist
35 durchsichtig. Gegenüber der Entnahmeöffnung 60 befindet sich

unterhalb des Bodens des Entnahmeraums 50 der Photomultiplier 314.

Fig. 12 zeigt eine Draufsicht auf ein zweites
5 Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung. Dabei sind
eine Mehrzahl der in Fig. 11 gezeigten Vorrichtungen
nebeneinander angeordnet. An den Längsseiten der
Vorrichtungen sind jeweils Thermostatplatten 329 vorgesehen,
mit denen die Temperatur einstellbar ist.

10

Fig. 13 zeigt in schematischer Querschnittsansicht ein
zweites Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und
Anreicherungsvorrichtung. Dabei sind die Elektroden 20a und
20b einer Vorrichtung gemäß Fig. 11 mit einer Spannungsquelle
15 220 verbunden. Die Vorrichtung gemäß Fig. 11 befindet sich im
Wirkbereich eines x,y,z-Pipettierarms 190 eines x,y,z-
Pipettierroboters. Die Spannungsquelle 220, die zweite Pumpe
130 zur Entsorgung von zu verwerfenden Lösungen, eine
Vorrichtung (hier nicht gezeigt) zur Bewegung eines
20 Permanentmagneten 312 sowie der x,y,z-Pipettierroboter sind
mittels eines Prozeßrechners, bsp. eines Personal-Computers,
vollautomatisch steuerbar.

Die Funktion der beschriebenen Vorrichtungen ist die
25 folgende:

Zu analysierende biologische nukleinsäurehaltige
Flüssigkeiten werden mit einem Adsorptionsmittel 100 in
Kontakt gebracht. Dabei adsorbieren die in der Lösung
30 befindlichen Nukleinsäuren am Adsorptionsmittel 100. Das mit
den Nukleinsäuren beladene Adsorptionsmittel 100, bsp. ein
Spin-column 90, wird durch die zweite Öffnung 80 in den
Reaktionsraum 17 eingesetzt. Anschließend wird an die
Elektroden 20a, 20b eine Gleichspannung im Bereich von 1 bis
35 5000 V, vorzugsweise von 25 bis 500 V, angelegt. Die negativ

geladenen Nukleinsäuren werden dadurch vom Adsorptionsmittel 100 gelöst und in Richtung der in der Nähe des Entnahmeraums 50 angeordneten Anode 20b bewegt. Um einen direkten Kontakt der Nukleinsäuren mit der Anode 20b zu vermeiden, ist eine 5 für Nukleinsäuren undurchlässige erste permeable Membran 30 vorgesehen. Infolge der in Richtung der Anode 20b gerichteten Bewegung der Nukleinsäuren reichern sich diese im Entnahmeraum 50 an. Nach einer Elektrophoresedauer von 1 bis 10 180 min. wird der durch den Elektrophoresepuffer geleitete Strom abgeschaltet. Durch die Entnahmeöffnung 60 des Entnahmeraums 50 kann nun ein angereichertes Nukleinsäuren enthaltendes Elutionsvolumen entnommen werden.

Um Kontaminationen zu vermeiden, kann die Entnahmeöffnung 60 15 mit dem Schnappdeckel 326 verschlossen werden, der mit einem Septum 328 versehen ist. Zur Entnahme von Elutionsvolumen kann das Septum 328 mit einer Nadel 327 durchstochen werden.

Je nach Art der zu isolierenden Nukleinsäuren können 20 verschiedeneartig gestaltete Elektroden 20a, 20b verwendet werden. In Frage kommt die Verwendung von aus Edelmetall oder aus leitfähigen Kunststoffen hergestellten Elektroden, die beschichtet sein können.

25 Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann mit einer Einrichtung zur Detektion der Chemilumineszenz kombiniert werden. Dazu ist ein Photomultiplier 314 in der Nähe des Behälters 15 angeordnet. Zunächst werden die Nukleinsäuren elektrophoretisch vom Adsorptionsmittel 100 in Richtung der 30 Anode 20b bewegt. Im Bereich der Anode 20b kann sodann, bsp. nach der Polymerasekettenreaktion, eine Amplifikation der Nukleinsäuren durchgeführt werden. Die amplifizierten Nukleinsäuren werden dann durch Zugabe von Magnetpartikeln gebunden. Durch Heranführen des Permanentmagneten 312 an die 35 Anode 20b werden die mit Nukleinsäuren beladenen

Magnetpartikel an die Anode 20b angezogen. Nach Zugabe eines Chemilumineszenspuffers und Anlegen einer Spannung über den Elektroden 20a, 20b wird eine Chemilumineszens ausgelöst. Das dabei ausgesendete Licht wird durch den Photomultiplier 314
5 detektiert.

Die vorerwähnten Funktionen können mittels eines x,y,z-Pipettierroboters automatisiert werden. Damit ist es möglich, eine Mehrzahl der erfindungsgemäßen Vorrichtungen
10 nacheinander automatisch zu bedienen.

Eine automatische Isolation von Nukleinsäuren kann mit den in den Fig. 4 und 13 gezeigten Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtungen durchgeführt werden. Dabei hat
15 sich folgendes Steuerungsprogramm als zweckmäßig erwiesen:

Schritt Nr.	Gerätemodul	Arbeitsschritt
1	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
2	x,y,z-Pipettor	gehe zu Probengefäß 165
3	x,y,z-Pipettor	nehme 210 µl Probe auf
4	x,y,z-Pipettor	gehe zu Reaktionsrörchen 150
5	x,y,z-Pipettor	dispensiere 200 µl
6	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
7	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
8	x,y,z-Pipettor	gehe zu erstem Gefäß 160
9	x,y,z-Pipettor	nehme 710 µl Lyse-Reagenz auf
10	x,y,z-Pipettor	gehe zu Reaktionsrörchen 150
11	x,y,z-Pipettor	dispensiere 700 µl Lyse-Reagenz
12	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
13	Thermomixer	schüttle für 1 min
14	Thermomixer	erhitze auf 75 °C
15	Steuerung	warte 10 min.
16	Thermomixer	kühle auf 25 °C

17	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
18	x,y,z,-Pipettor	gehe zu Reaktionsrörchen 150
19	x,y,z-Pipettor	nehme 810 µl Lysemischung auf
20	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweiter Öffnung 80
21	x,y,z-Pipettor	dispensiere 800 µl Lysemischung
22	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
23	Pumpe (130)	pumpe Lysemischung durch Adsorptionsmittel und verwerfe
24	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
25	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweitem Gefäß 162
26	x,y,z-Pipettor	nehme 710 µl Wasch-Reagenz auf
27	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweiter Öffnung 80
28	x,y,z-Pipettor	dispensiere 700 µl Waschlösung
29	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
30	zweite Pumpe 130	pumpe Waschlösung durch Adsorptionsmittel und verwerfe
31	erste Pumpe 120	pumpe Elektrophoresepuffer in den Tank
32	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
33	x,y,z-Pipettor	gehe zu Elektrophoresepuffervorrat 110
34	x,y,z-Pipettor	nehme 250 µl Elektrophoresepuffer auf
35	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweiter Öffnung 80
36	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
37	Spannungsversorgung 220	lege Spannung an Elektroden 20a, 20b
38	Steuerung	warte 20 min
39	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
40	x,y,z-Pipettor	nehme 60 µl isolierte Nukleinsäure aus Entnahmöffnung 60 auf
41	x,y,z-Pipettor	gehe zu PCR-Gefäßen 210
42	x,y,z-Pipettor	dispensiere 50 µl in PCR-Gefäße 210
43	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
44	zweite Pumpe 130	pumpe Elektrophoresepuffer aus dem Tank und verwerfe

Beispiel 1

Aufarbeitung einer Vollblutprobe mit Spin-column und Elektrophorese:

Alle Reagenzien sind aus dem QIAampTMBlood Kit (Kat.Nr. 29104) der Firma Qiagen, Hilden entnommen. Nach Lyse und Adsorption der Nukleinsäure laut Protokoll des Herstellers wurde das Glasfaservlies aus dem QIAamp spin column herausgenommen und in ein speziell präpariertes Agaroseflachbettgel gemäß Fig. 5 gegeben. Die erste Ausnehmung 81 dient zur Aufnahme des Glasvlieses und die zweite Ausnehmung 61 ist mit Elektrophorespuffer befüllt. Auf diese Weise kann die Nukleinsäure elektrophoretisch aus dem Glasvlies eluiert und in das anschließende Agarosegel und in die zweite Ausnehmung 61 überführt werden. Aus der zweiten Ausnehmung 61 wurde die isolierte konzentrierte Nukleinsäure entnommen.

Beispiel 2

20

Aufarbeitung einer Plasmaprobe

Alle Reagenzien sind aus dem QIAampTMBlood Kit (Kat.Nr. 29104) der Firma Qiagen, Hilden entnommen. Zur Aufarbeitung wurde das Glasfaservlies aus dem QIAamp spin column entfernt und in die Vorrichtung gemäß Fig.1 so eingesetzt, daß es am unteren Auslaß positioniert war. Das Volumen des gesamten Reaktionsgefäßes war 2 ml. Es wurden 200 µl Plasma laut Arbeitsanweisung des Herstellers verarbeitet. Statt Zentrifugation erfolgte das Absaugen mit einer Membranpumpe der Fa. Eppendorf. Zur elektrophoretischen Elution wurde ein Elektrophoresepuffer nach Andrews A.T. (Andrew A.T.: Electrophoresis, Claredon Press, Oxford, 1985, S. 160) verwendet. Als permeable Membran diente ein Dialyseschlauch der Fa. Neolab, Heidelberg (Best.Nr.: 2-9022). Als Elektroden

20a, 20b wurden Drähte mit 0,3 mm Durchmesser einer Platin-Ruthenium-Legierung verwendet und als Spannungsgeber der Elektrophoresespannungsgeber der Fa. Hölzel, Dorfen. Aus der Entnahmeöffnung 60 wurden 30 µl Elutionsvolumen mit der
5 Nukleinsäure entnommen.

Beispiel 3

10 Isolierung von DNA aus Hühnerblut

Von einem frisch geschlachteten weißen Masthuhn wurde Vollblut aus der Halsschlagader aufgefangen und sofort mit Ethylendiamintetraessigsäure (Fa. Sigma, München Best. Nr. E-5513) in einer Konzentration von 0,06 g EDTA/ml Vollblut versetzt. Das EDTA-Vollblut wurde portioniert eingefroren und bei -15°C gelagert. Alle Reagenzien sind dem "High Pure PCR Template Preparation Kit" der Fa. Boehringer Mannheim (Best. Nr. 1 796 828) entnommen. 100 µl EDTA-Vollblut (s.o.) wurden mit 200 µl Lyse-Puffer und 60 µl Proteinase K jeweils aus dem o.g. Reagenziensatz gemischt und 15 min. bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 100 µl Isopropanol (Fa. Roth, Karlsruhe Best.Nr. 9866) hinzugegeben und kräftig gemischt. Anschließend wird die zähflüssige Reaktionsmischung mit einer Vakuumpumpe (Eppendorf, Hamburg Nr. 4151) durch das Glasvlies gesaugt. Danach wurde das Vlies mit fünfmal 500 µl Waschpuffer (aus Kit s.o.) mit 80 % Ethanol (Fa. Roth, Karlsruhe Best. Nr. 5054) gewaschen. Dann wurde das Vlies aus dem Filter-Tube entfernt und in eine Vorrichtung gemäß Fig. 5 in die erste Ausnehmung 81 überführt. Anschließend wurden ca. 0,5 ml Elektrophoresepuffer (10 mM Tris-HCl [Fa. Sigma, München Best.Nr. T-8529] 5 mM Natrium-Aacetat [Fa Sigma, München Best. Nr. S-3272] 0,5 mM EDTA [s.o.] pH 8,2) auf das Vlies in die erste Ausnehmung 81 zupipettiert, der zuvor auf 35 70 °C erhitzt worden war. Danach wurde die Elektroelution

durch Anlegen einer Gleichspannung von max. 10 mA bei ca. 60
5 grd. C durchgeführt. Als Spannungsquelle diente ein
Elektrophoresetransformator der Fa Hölzel, Dorfen (Nr. 0 628/
1985). Die Elution erfolgte in Fraktionen 1-7, wobei nach
10 definierter Zeit (10-15 min) mit einer Eppendorf pipette
Fraktionen von ca 50 µl aus der Öffnung (61) entnommen und
gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden auf einem Agarosegel
15 (0,05 mg Agarose in 60 ml Elektrophoresepuffer mit 40 µl
Ethidiumbromidlösung [100 mg Ethidiumbromid (Fa. Sigma,
München Nr. E-8751) in dest. Wasser] analysiert. Als
Kontrolle wurden 40 µl Lysemischung verwendet. Die Kontrolle
und Fraktionen nach 15 min. Elektroelution zeigten eine
fluoreszierende Bande nach Elektrophorese von 5 min. bei ca.
40 V und max. 50 mA unter Beleuchtung mit einer UV-Lampe der
15 Fa. Roger Electronic Products (Nr. MD-1782GS). Als
Spannungsquelle diente ein Elektrophoresetransformator der Fa
Hölzel, Dorfen (Nr. 0 628/ 1985).

20 Beispiel 5

Herstellung einer beschichteten elektrisch leitfähigen Kunststoffelektrode (Fig. 9)

25 Zunächst wird biotinyliertem Rinder-Immunglobulin G (R-IgG)
hergestellt. Dazu werden 0,5 ml einer R-IgG-Lösung (2mg R-IgG
(Boehringer Mannheim Cat.No. 1293621103 in 1 ml PBS (NaH₂PO₄*1 H₂O 2,76 g/l; Na₂HPO₄*2H₂O 3,56 g/l; NaCl 8 g/l; pH 7,25)) mit 6 µl D-Biotinoyl-ε-aminocapronsäure-N-
30 hydroxysuccinimidesterlösung in PBS und DMSO (Ansatz laut
Biotin Labeling Kit von Boehringer Mannheim Best. Nr.
1418165) vermischt und 2,5 h bei Raumtemperatur auf einem
Magnetrührer gerührt und anschließend über Nacht stehen
lassen. Das molare Verhältnis von Biotin: R-IgG beträgt 20:1
35 bei diesem Ansatz.

Zur Beschichtung von elektrisch leitfähigem Kunststoff mit biotinyliertem R-IgG werden aus einem Rohling, hergestellt im Spritzgußverfahren aus PRE-ELEC TP 4474 (Premix Oy, 5 Finnland), Scheiben von 4 mm Durchmesser ausgeschnitten, in einen Napf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte gelegt und in einer Lösung von 0,2 ml Beschichtungspuffer (NaHCO₃ 4,2 g/l; pH 9,6) dreimal, dann in einer Lösung von 40 ml Beschichtungspuffer (NaHCO₃ 4,2 g/l; pH 9,6) und 6 µl R-IgG-10 Biotin-Lösung gewaschen. Die Beschichtung erfolgt über Nacht.

Anschließend werden die Scheiben 3 x mit je 100 ml Milli-Q-Wasser gewaschen, wobei durch Sedimentation oder 15 Zentrifugation die Trennung von fester und flüssiger Phase erfolgt. Anschließend werden die Scheiben in 40 ml PBS wieder aufgenommen.

Beispiel 6

20 Durchführung einer Probenvorbereitung mit Elektroelution, Amplifikation und Elektrochemilumineszenz-Messung zum Nachweis von PCR-Amplifikaten

25 Die in Fig. 14 gezeigte Vorrichtung wurde zur Durchführung der Isolierung, Amplifikation und Chemilumineszenzmessung automatisch mit einem Computer-Programm mit den folgenden Programmschritten gesteuert:

Prozeßmodule	Einzelschritte
Probenvorbereitung	
Lyse	Probe, Lysemischung, Proteinase K in Reaktionsraum 17 pipettieren
	Reaktionsraum 17 verschließen
	Reaktionsraum 17 auf 70 °C temperieren
	Reaktionsraum 17 auf RT kühlen

	Reaktionsraum 17 öffnen
	Isopropanol zugeben
	Reaktionsmischung aus Reaktionsraum 17 durch zweiten Stutzen 85 absaugen
Elektroelution	Elutionspuffer zugeben
	Spannung an Elektroden 20a, 20b anlegen
	Nukleinsäure wandert in den Entnahmeraum 50
Amplifikation	Zugabe von PCR-Mix in den Entnahmeraum 50
	Verschließen von zweitem Stutzen 85, zweiter Öffnung 80 und Entnahmeöffnung 60
	zyklisches Heizen und Abkühlen des Entnahmeraums 50
Denaturierung	Öffnen der Entnahmeöffnung 60
Sonden annealing	Zugabe von Ru-Sonde
	Verschließen von Entnahmeöffnung 60
	Aufheizen und Abkühlen des Entnahmeraums 50
Detektion	Öffnen von Entnahmeöffnung 60
	Zugabe von SA-Magnetpartikel durch Entnahmeöffnung 60
	Verschließen von Entnahmeöffnung 60
Magnetseparation	Anlegen von Dauermagnet 312 mit Magnetfeld für den Entnahmeraum 50
	Absaugen von Reaktionsmischung aus dem Entnahmeraum 50
Magnetpartikel waschen (Option)	Zugabe von Waschlösung durch Entnahmeöffnung 60
	Entfernen des Magnetfeldes für den Entnahmeraum 50
	Absaugen der Waschlösung durch zweiten Stutzen 85
	Zugabe von Assay-puffer durch Entnahmeöffnung 60
Elektrochemilumineszenz-Messung	Anlegen von Spannung an die Elektroden 20a,b
	Messung der Lumineszens mittels Photomultiplier 314

Bezugszeichenliste

10	Elektrophorosepuffertank
11	Agaroseflachbettgel
5 15	Behälter
17	Reaktionsraum
20a	Kathode
20b	Anode
30	erste permeable Membran
10 31	zweite permeable Membran
40	O-Ring
41	erster Stutzen
42	erste Öffnung
43	Durchbruch
15 44	zweiter Stutzen
45	dritter Stutzen
46	dritte Öffnung
49	Kanal
50	Entnahmeraum
20 60	Entnahmeöffnung
61	zweite Ausnehmung
70	Füllstand
80	zweite Öffnung
81	erste Ausnehmung
25 85	zweiter Stutzen
90	Spin-column
100	Adsorptionsmittel
110	Elektrophoresepuffervorrat
120	erste Pumpe
30 125	Füllstutzen
130	zweite Pumpe
140	Ableitung
150	Reaktionsröhrchen
160	erstes Gefäß
35 162	zweites Gefäß

165	Probengefäß
170	Schüttelbock
180	Pipettenspitze
185	Vorrat an Pipettenspitzen
5 190	x, y, z-Pipettierarm
210	PCR-Gefäße
220	Spannungsquelle
225a, b	elektrische Zuleitungen
302	Stützvlies
10 303	weiteres Stützvlies
310	semipermeable Membran
312	Permanentmagnet
313	Magnetpartikel
314	Photomultiplier
15 316	durchsichtiger Schnappdeckel
318	Schlauchstück
320, 321	Ausnehmungen
323	erste Lage
324	dritte Lage
20 325	zweite Lage
326	Schnappdeckel
327	Nadel
328	Septum
329	Heizplatten
25 340	Stopfen
400	Deckel
401	Vakuumanschluß
402	Anschlüsse
410	Mehrfachbehälter
30	

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei
 - a) die Nukleinsäuren an ein Adsorptionsmittel (100) gebunden werden,
 - b) die Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel (100) eluiert und
 - c) durch Elektrophorese von einem Reaktionsraum (17) in einen damit verbundenen Entnahmeraum (50) bewegt und dort angereichert werden.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Adsorptionsmittel (100) nach der Adsorption gewaschen wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Elution der Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel (100) mittels Pufferwechsel oder durch Elektrophorese erfolgt.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das im Entnahmeraum (50) befindliche Elutionsvolumen kleiner ist als das Probenausgangsvolumen.
- 25 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäuren vor der Adsorption durch Lyse freigesetzt werden.
- 30 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei biologischen Flüssigkeiten oder Suspensionen durch Verflüssigung aus festem Material hergestellt werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Adsorptionsmittel (100) aus Silicagel, Glaspartikeln, Glasfaservlies oder Ionenaustauschmaterial besteht.

5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Adsorptionsmittel (100) aus mit Glas umfangenen magnetischen Partikeln besteht, und die an magnetischen Partikel adsorbierten Nukleinsäuren mittels eines Magneten (312) isoliert werden.

10

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Hybridisierung durchgeführt wird.

15

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Amplifikation durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Chemilumineszenzdetektion durchgeführt wird.

20

12. Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei ein Reaktionsraum (17) zur Aufnahme eines mit Nukleinsäuren beladenen Absorptionsmittels (100) mit einem Entnahmeraum (50) verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren mittels einer Elektrophoreseeinrichtung (20a, 20b) vom Reaktions- (17) in den Entnahmeraum (50) bewegbar und dort anreicherbar sind.

25

30 13. Vorrichtung nach Anspruch 12, wobei der Reaktionsraum (17) von einem Elektrophoresepuffertank (10) umgeben ist.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, wobei der Reaktionsraum (17) mit dem Elektrophoresepuffertank (10) ionenleitend verbunden ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, wobei der Reaktionsraum (17) sich im Elektrophoresepuffertank (10) befindet.

5

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Reaktionsraum (17) über mindestens eine Öffnung (80) beschickbar und entsorgbar ist.

10 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei im Reaktionsraum (17) ein Adsorptionsmittel (100) für Nukleinsäuren aufgenommen ist.

15 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei die ionenleitende Verbindung durch mindestens eine permeable, Nukleinsäuren zurückhaltende Membran (31) gebildet ist.

20 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 18, wobei die Vorrichtung aus thermoplastischem Kunststoff hergestellt ist.

25 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Elektrophoreseeinrichtung mindestens zwei Elektroden (20a, 20b) aufweist, von denen mindestens eine in den Elektrophoresepuffertank (10) ragt oder Bestandteil desselben ist.

30 21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Elektrophoreseeinrichtung mindestens zwei Elektroden (20a, 20b) aufweist, von denen mindestens eine in den Entnahmeraum (50) ragt oder Bestandteil eines den Entnahmeraum (50) umgreifenden Behälters (15) ist.

35 22. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, wobei eine der Elektroden (20a, 20b) in den Reaktionsraum (17) ragt oder

Bestandteil eines den Reaktionsraum (17) umgreifenden Behälters (15) ist.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei mindestens eine der Elektroden (20a, 20b) aus einem elektrisch leitfähigen Kunststoff hergestellt ist.

5 24. Vorrichtung nach Anspruch 23, wobei der elektrisch leitfähige Kunststoff elektrisch leitfähige Zuschlagstoffe, 10 wie Graphit, Eisen, Silber oder andere Metalle, enthält.

15 25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 24, wobei der Widerstand der Elektroden (20a, 20b) kleiner als $100 \text{ M}\Omega$ ist.

26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 25, wobei die Elektroden (20a, 20b) eine Beschichtung aufweisen.

20 27. Vorrichtung nach Anspruch 26, wobei die Beschichtung aus mehreren Lagen (323, 324, 325) besteht.

25 28. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei mindestens eine Lage (323, 324, 325) aus einem biologischen Polymer gebildet ist, das vorzugsweise ein bindefähiges Protein ist.

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das bindefähige Protein ein Antikörper, ein Antigen oder eine Komponente eines anderen Ligand-Rezeptor-Paares ist.

30 30. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer derart ist, daß daran Nukleinsäuren bindbar sind.

31. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer ein Oligonukleotid ist.

32. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer ein proteinähnliches Aminosäure-Konstrukt (PNA-Konstrukt) ist.

5 33. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei eine der Lagen (323, 324, 325) aus chemisch reaktiven Linkermolekülen besteht.

10 34. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zwei Elektroden (20a, 20b) in Gegenüberstellung in der Wandung des Behälters (15) vorgesehen sind.

15 35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 34, wobei Mittel (312) zu Erzeugung eines an- und abschaltbaren Magnetfelds so angeordnet sind, daß der Behälter (15) vom 15 Magnetfeld durchdringbar sind.

20 36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 35, wobei in der Nähe des Behälters (15) eine Detektionseinrichtung, vorzugsweise ein Photomultiplier (314), angeordnet ist.

20 37. Vorrichtung nach Anspruch 36, wobei der Behälter (15) ein optisches Fenster (316) besitzt.

25 38. Elutionsvorrichtung mit einer Mehrzahl von Vorrichtungen nach einem der Ansprüche 12 bis 37, wobei die den Vorrichtungen zugeordneten Elektroden (20a, 20b) elektrisch miteinander und mit einer Stromquelle (220) verbunden sind.

30 39. Elutionsvorrichtung nach Anspruch 38, wobei die Vorrichtungen geometrisch im 96-Napf-Mikrotitrationsplattenformat angeordnet sind.

40. Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtung mit einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 37 oder einer

Elutionsvorrichtung nach Anspruch 38 oder 39, wobei mindestens eine der folgenden Einrichtungen vorgesehen ist:

- x,y,z-Pipettierarm (190),
- Thermo-Schüttelbock (170),
- 5 - Heiz-/Kühlmittel (329) zum zyklischen Heizen und Kühlen,
- Spannungsquelle (220),
- mindestens zwei Elektroden (20a, 20b),
- mindestens eine Pumpe (120, 130),
- 10 - mindestens ein Magnet (312),
- mindestens ein Photomultiplier (314).

41. Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtung nach Anspruch 40, wobei die Vorrichtung, die Elutionsvorrichtung und die 15 Einrichtung/en mittels eines Prozeßrechners automatischen zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 steuerbar sind.

Seite 1/16

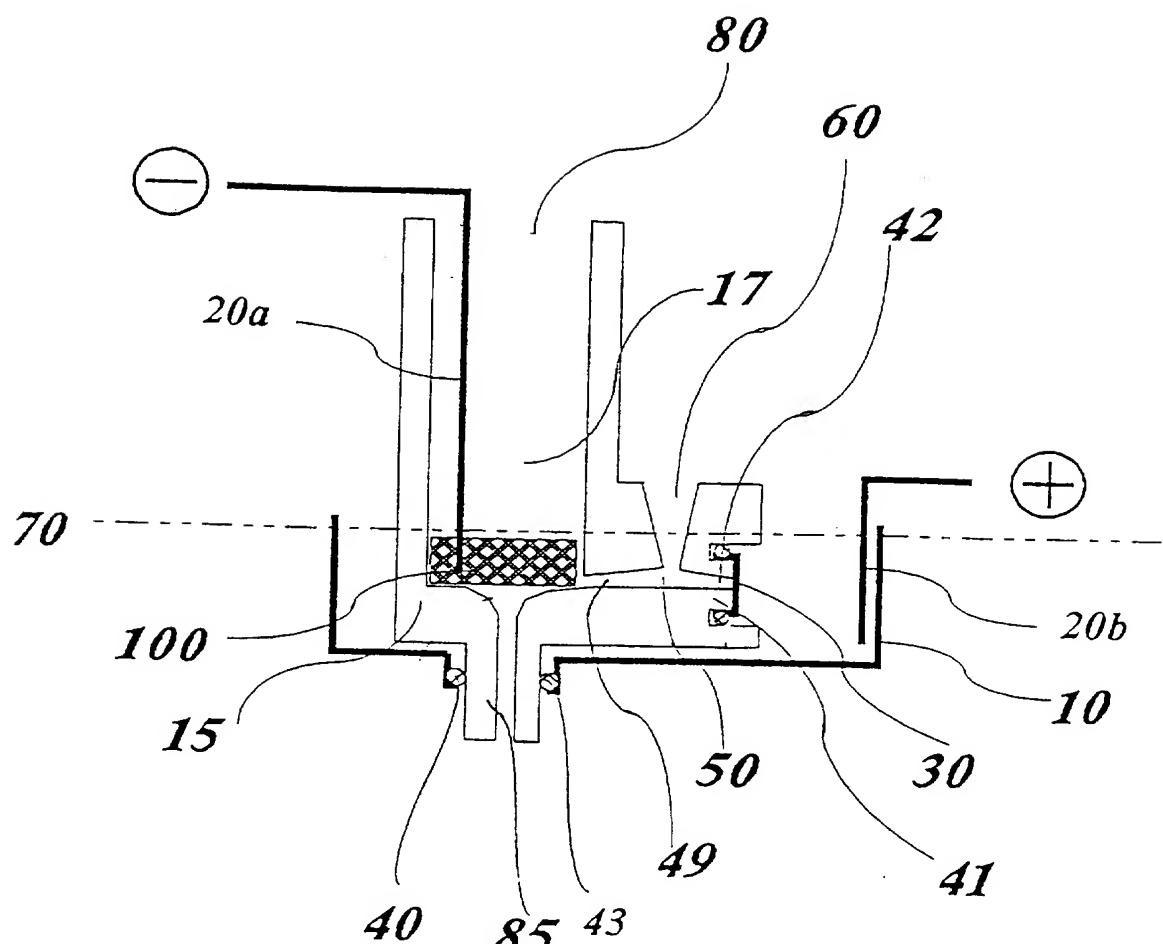


Fig. 1

Seite 2/16

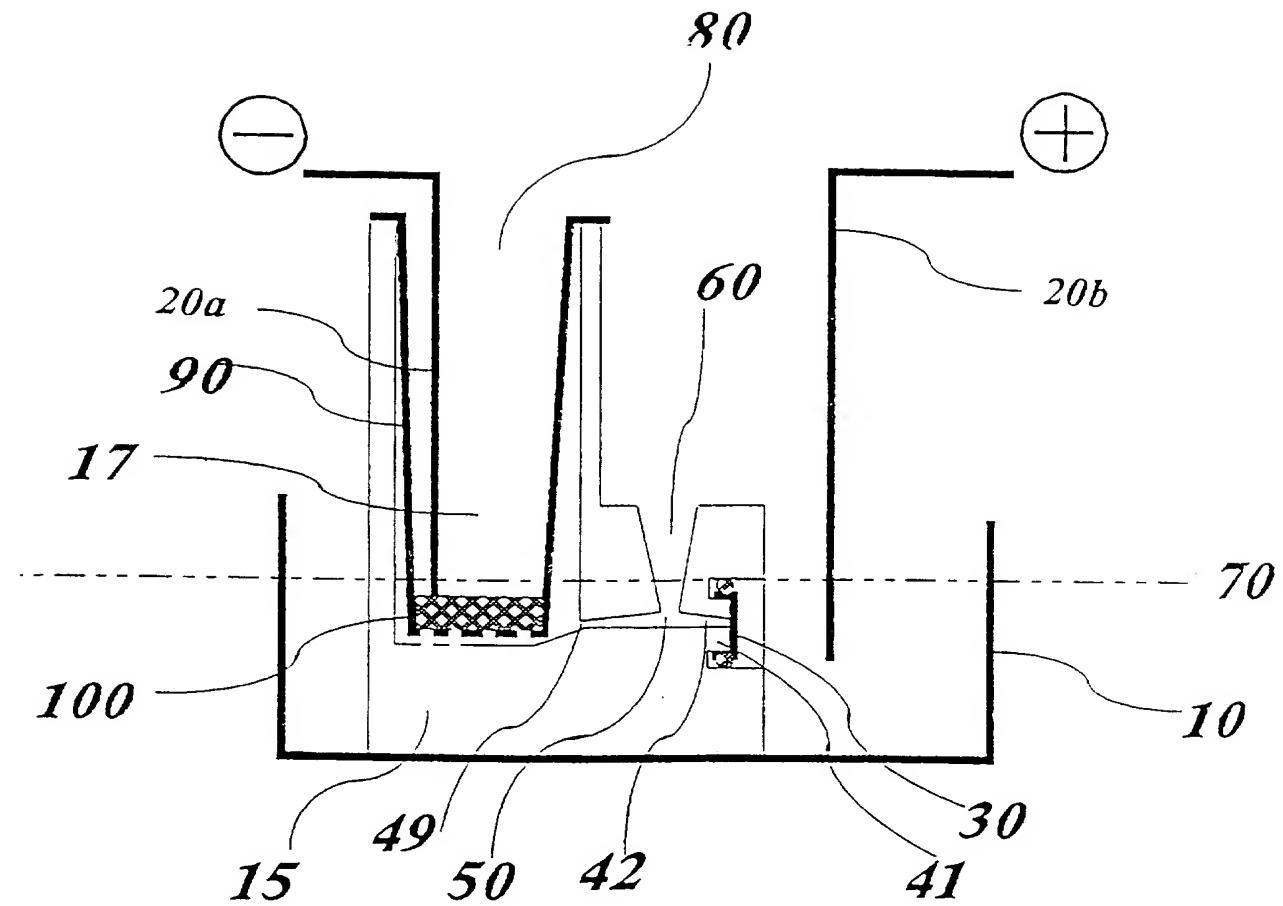


Fig. 2

Seite 3/16

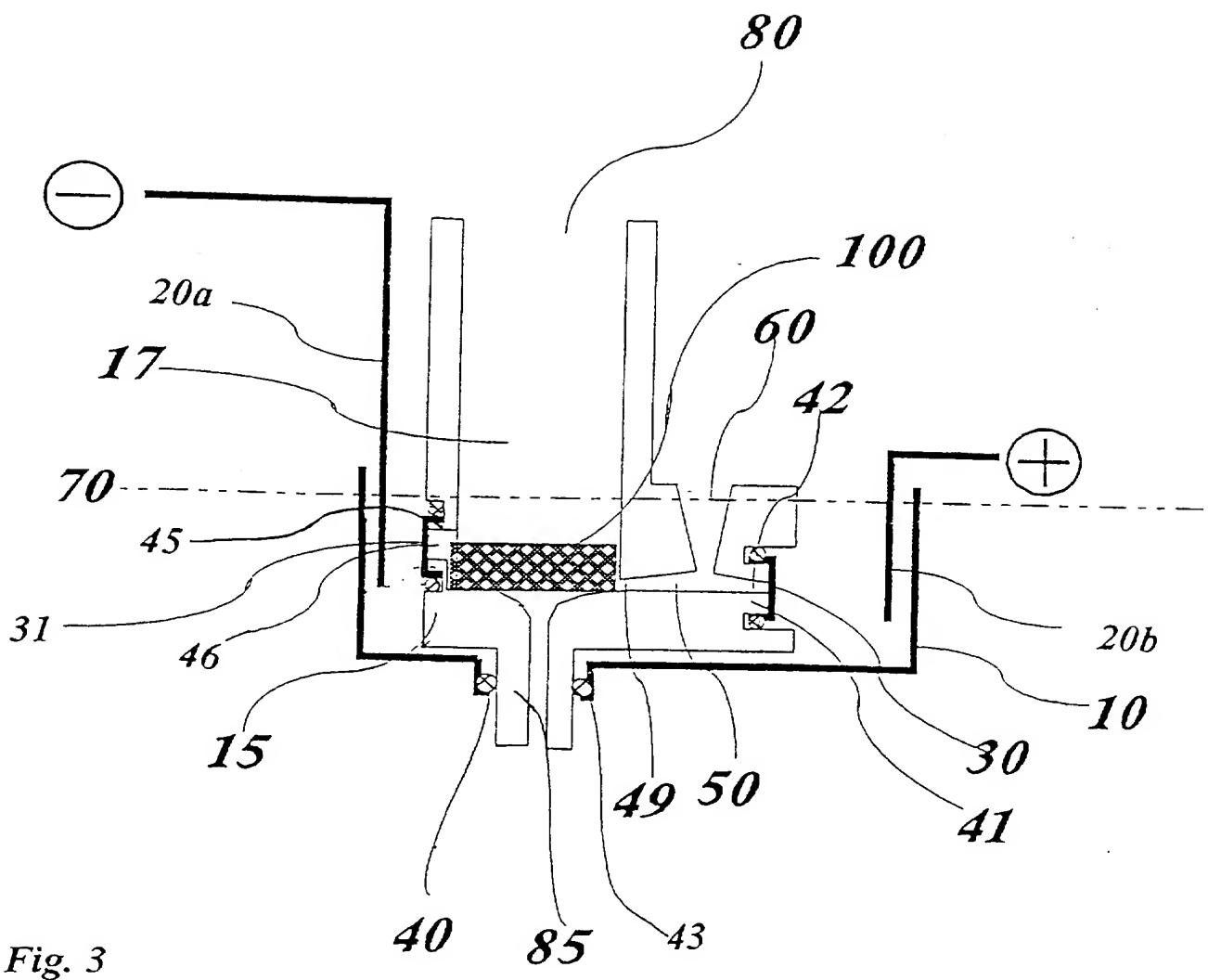


Fig. 3

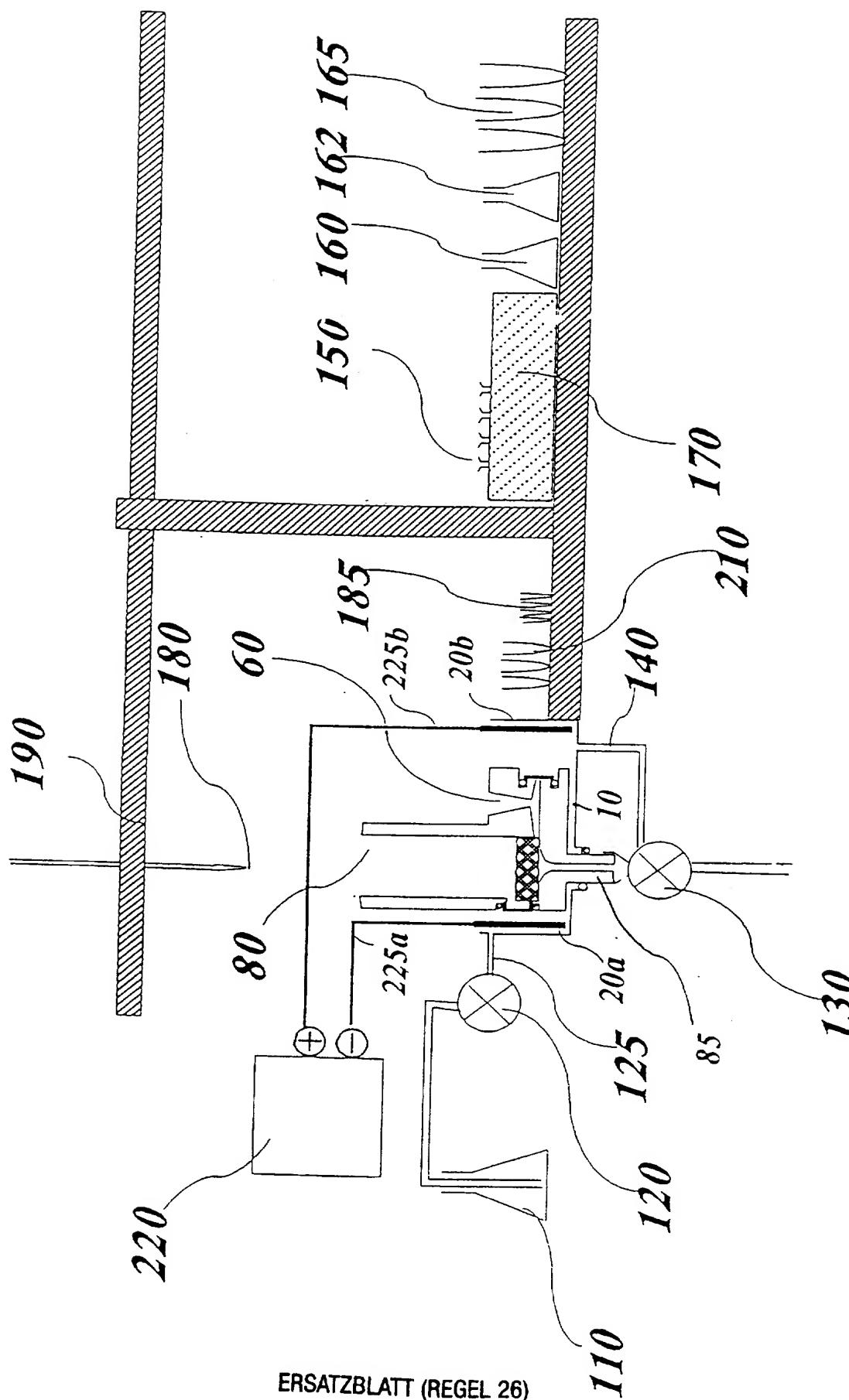


Fig. 4

Seite 5/16

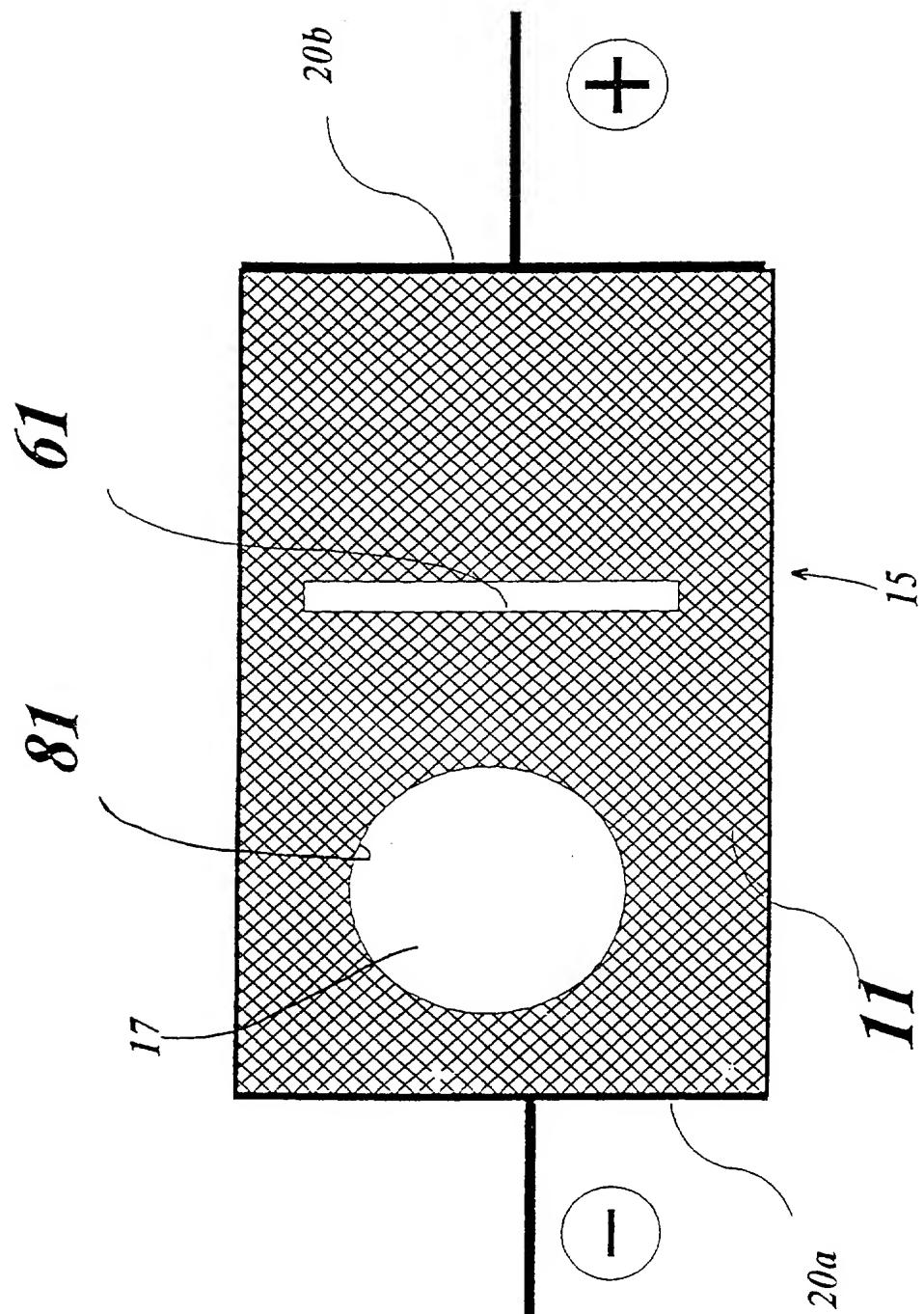


Fig. 5

Seite 6/16

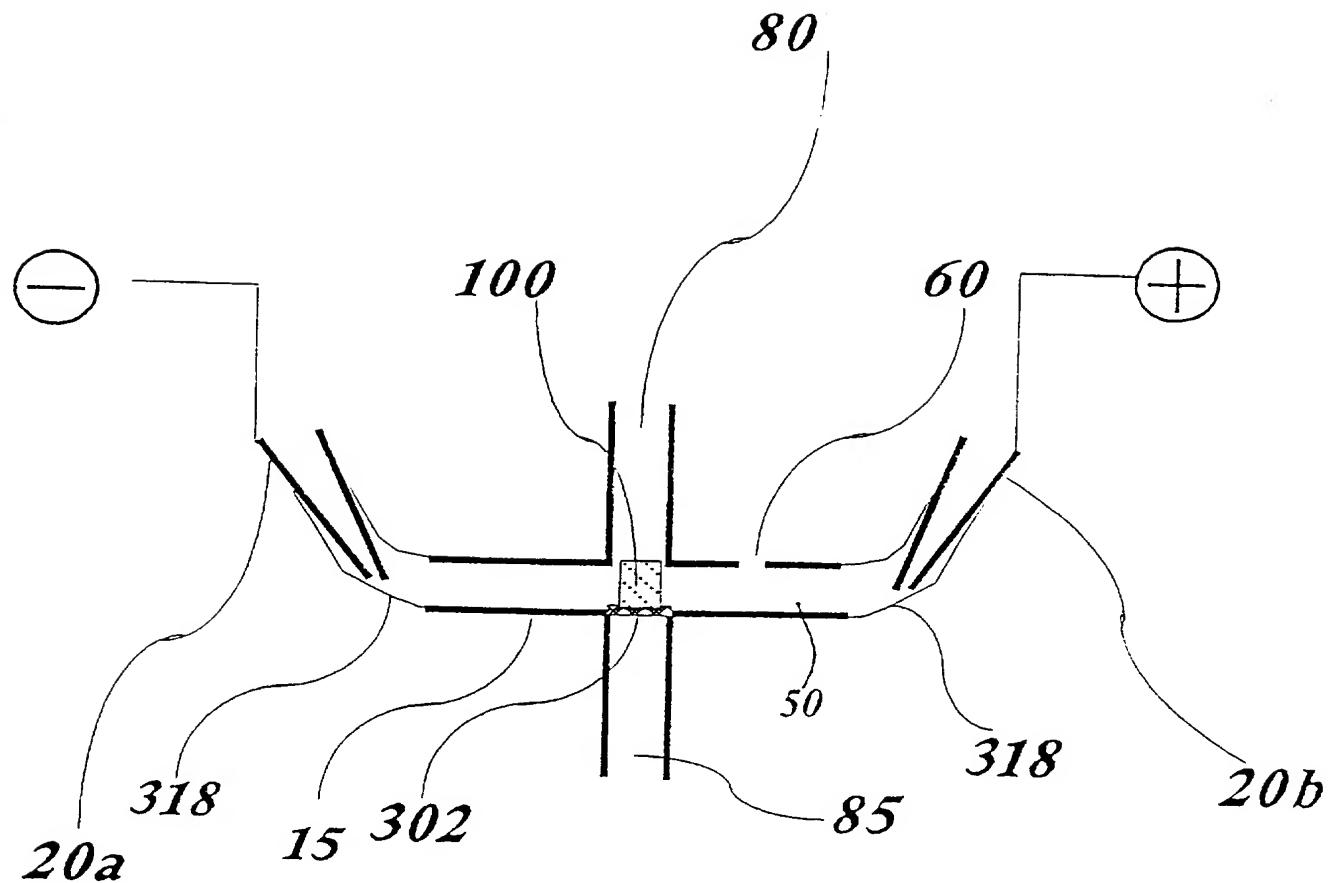


Fig. 6a

Seite 7/16

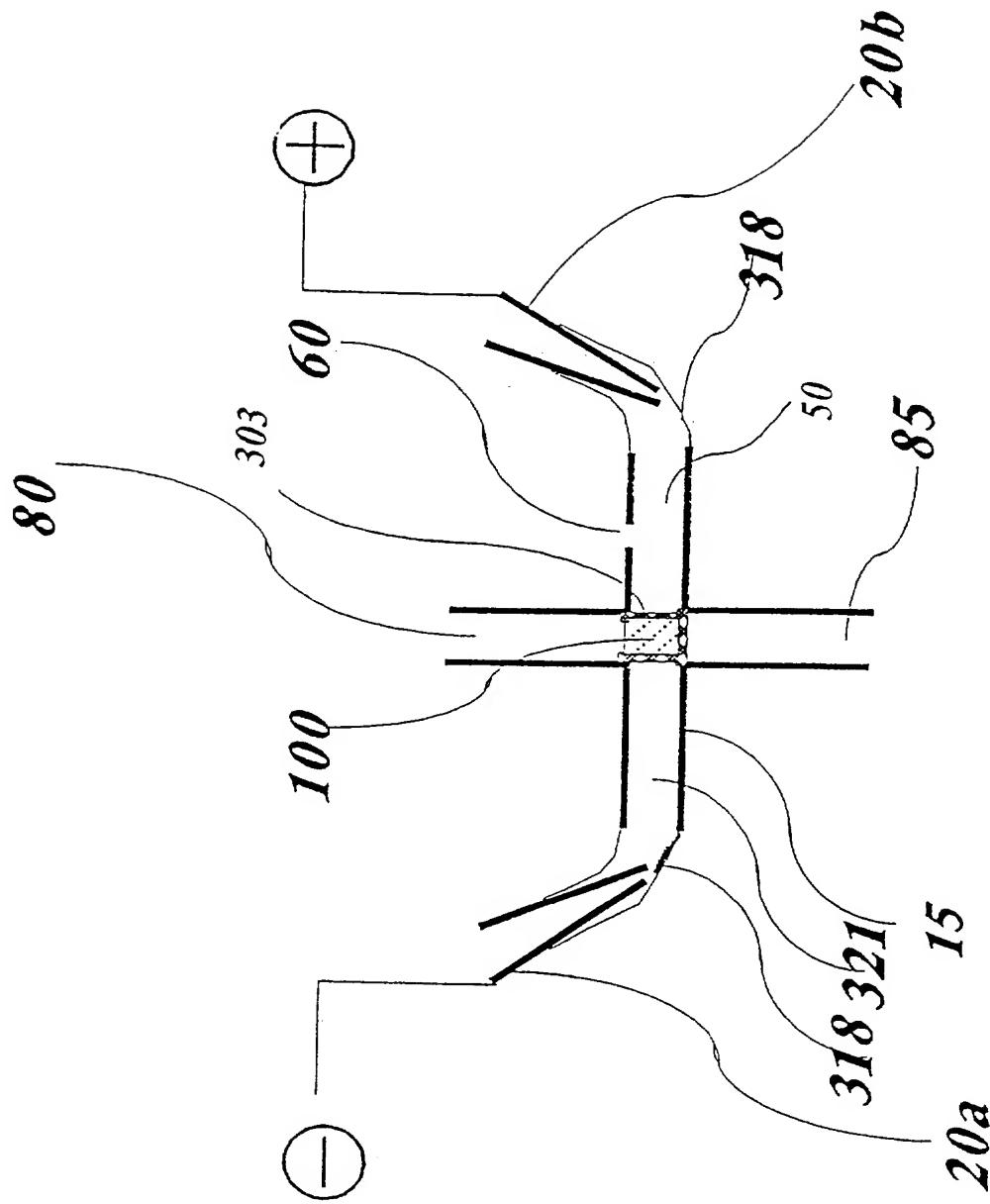


Fig. 6b

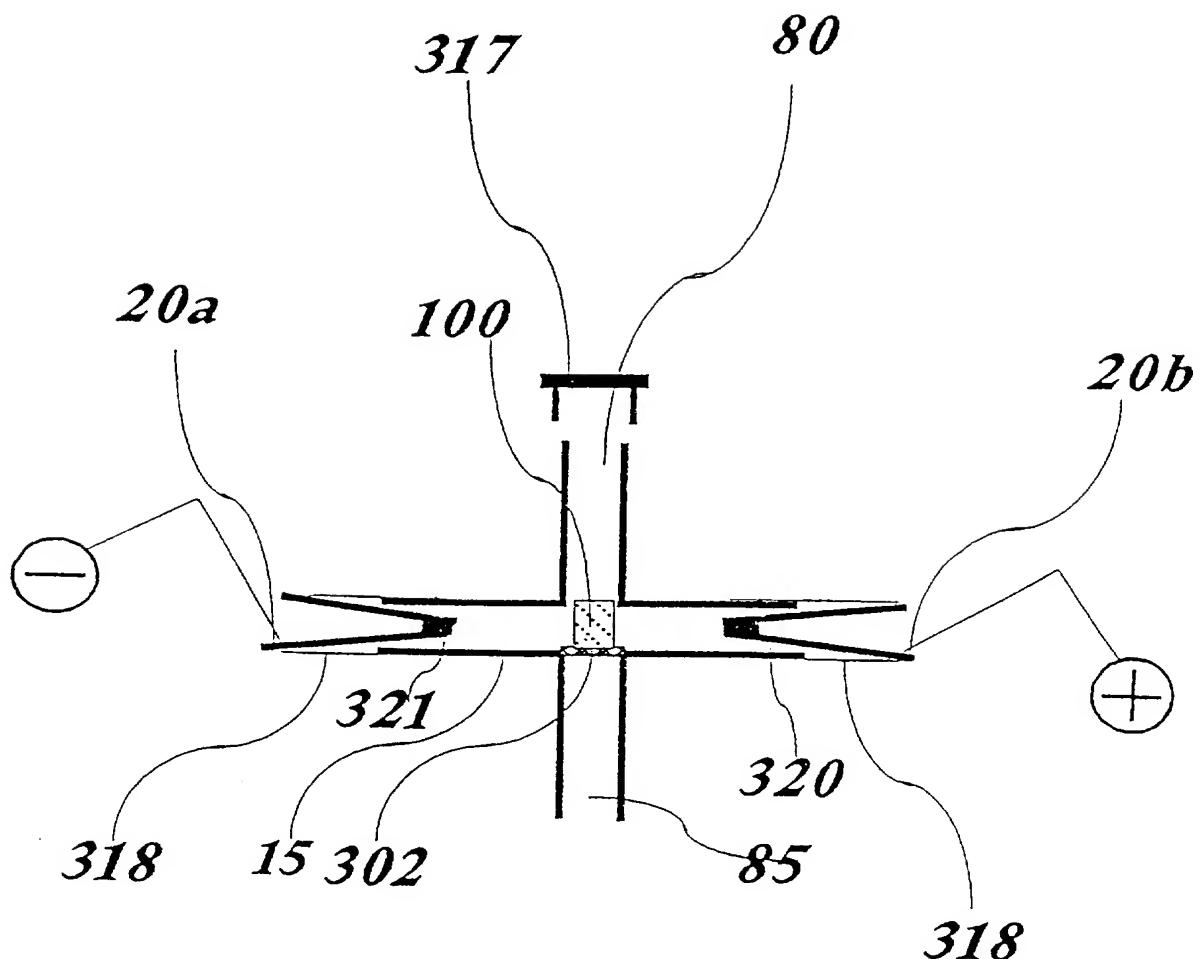
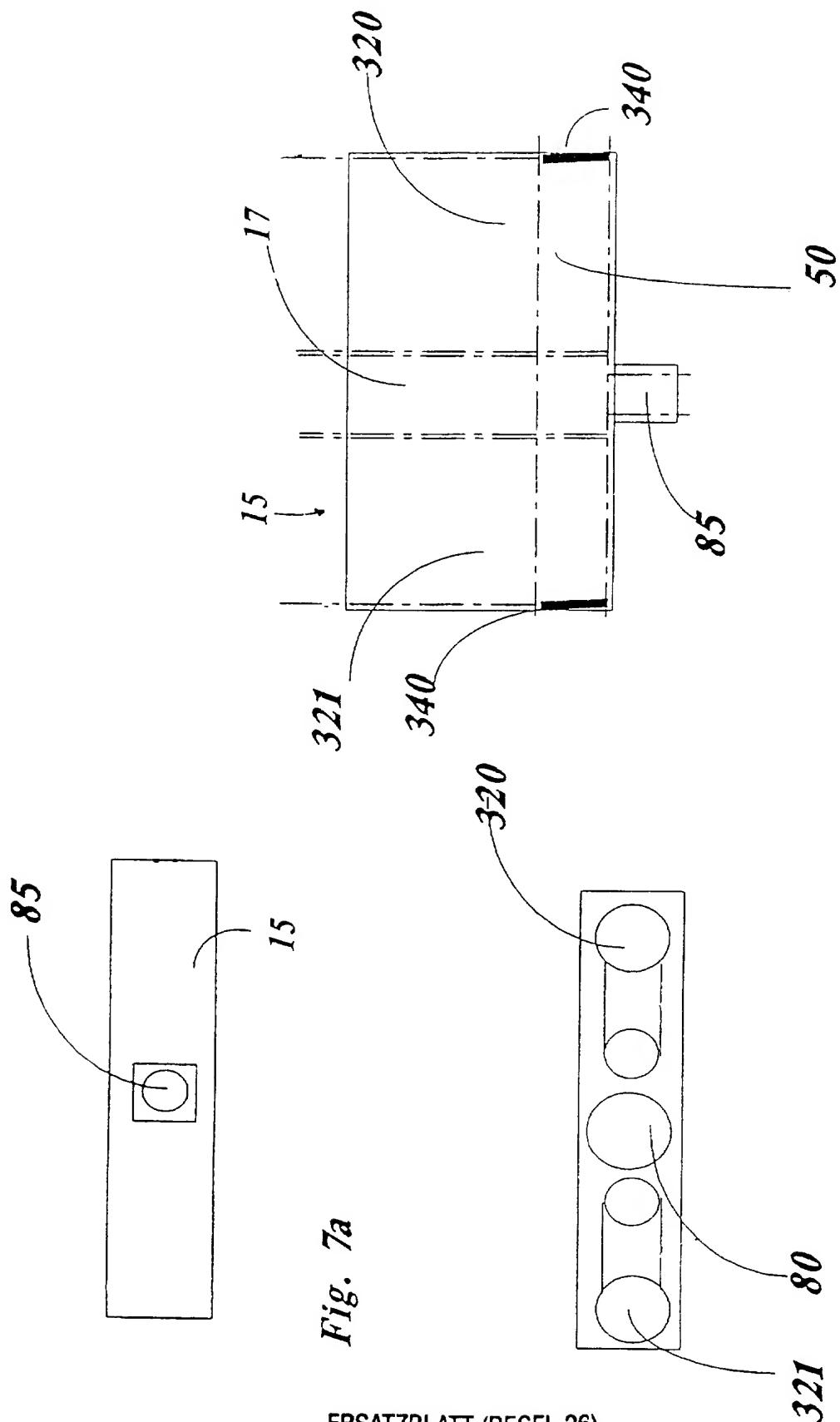
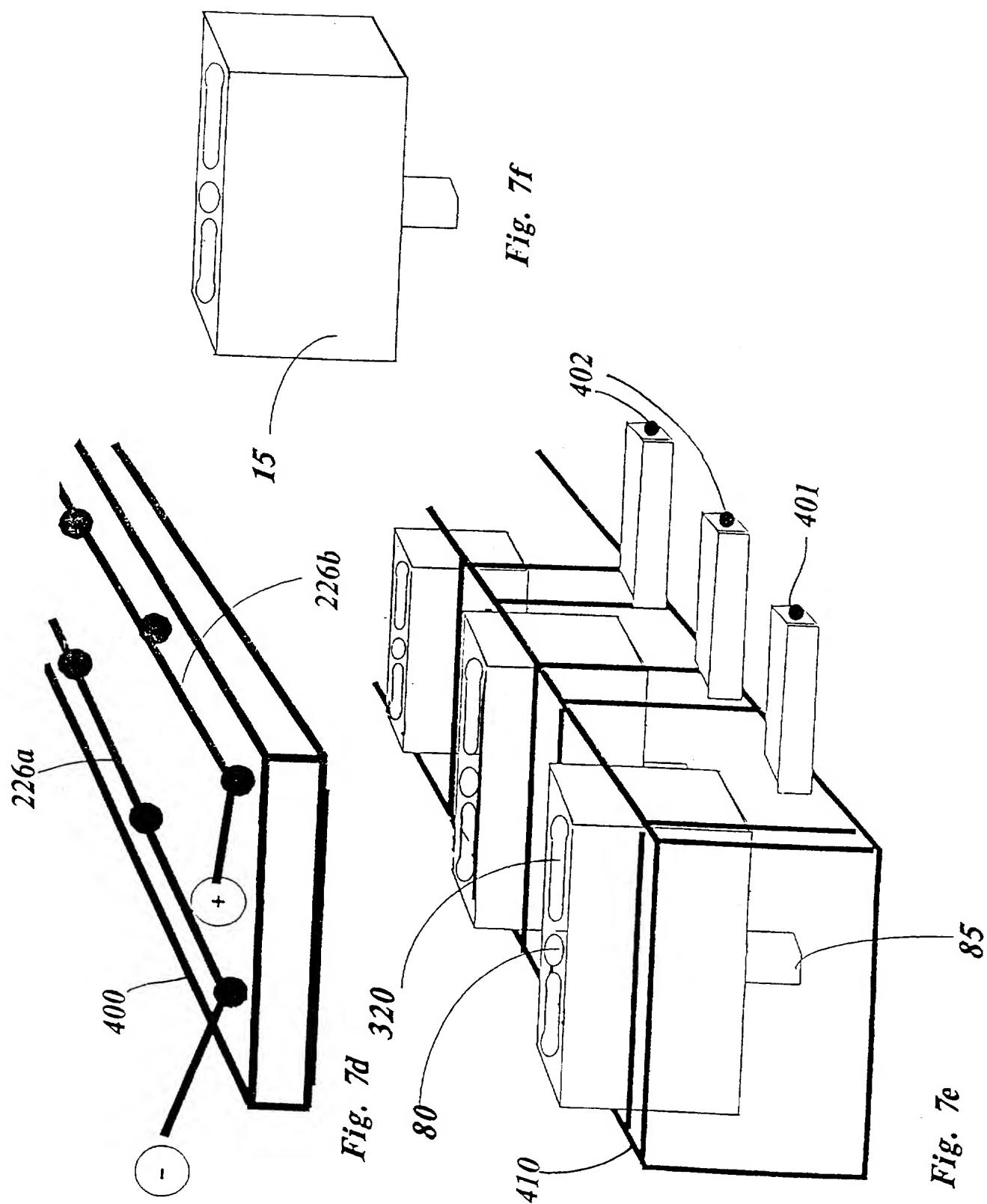


Fig. 6c

Seite 9/16





Seite 11/16

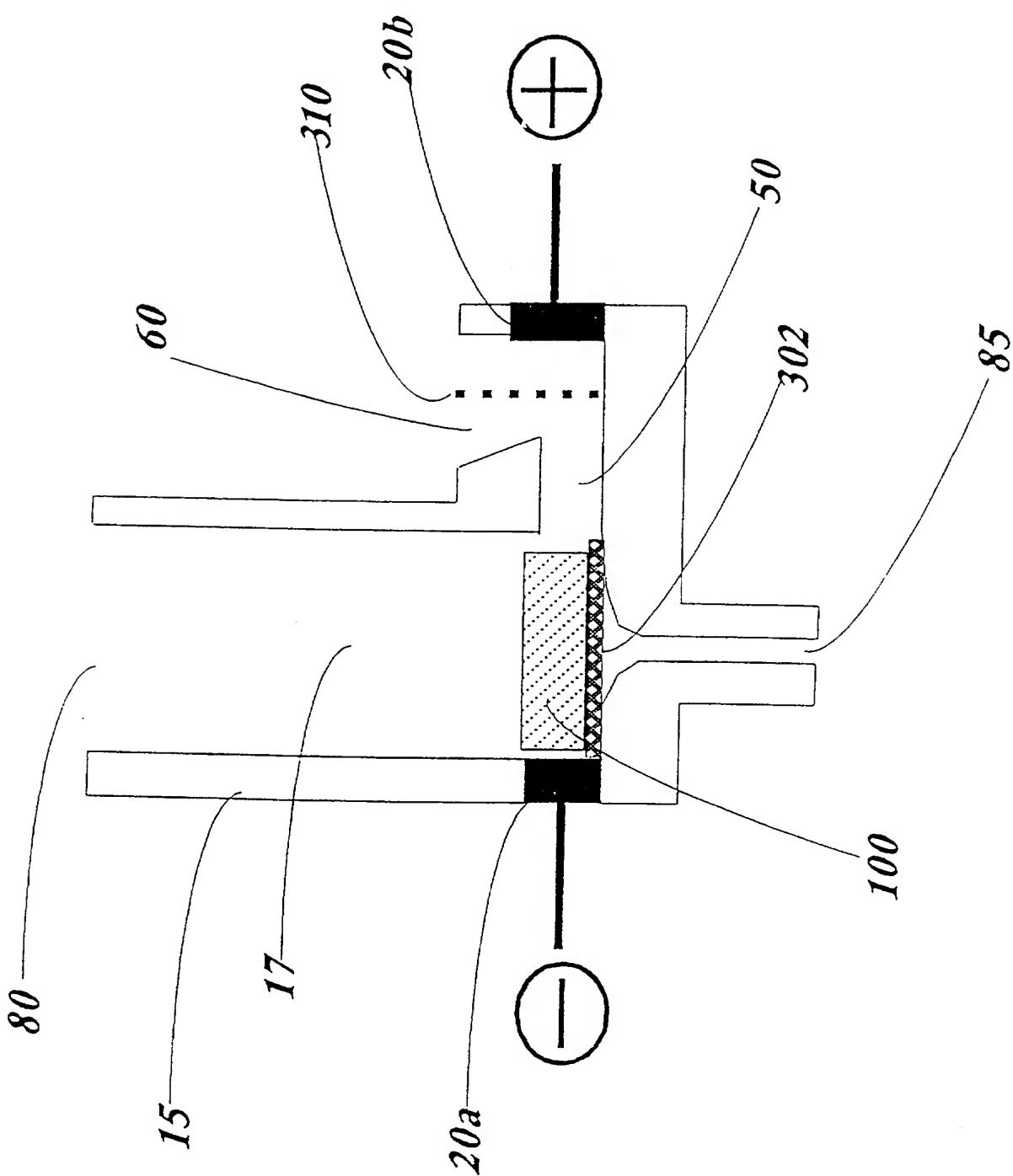


Fig. 8

Seite 12/16

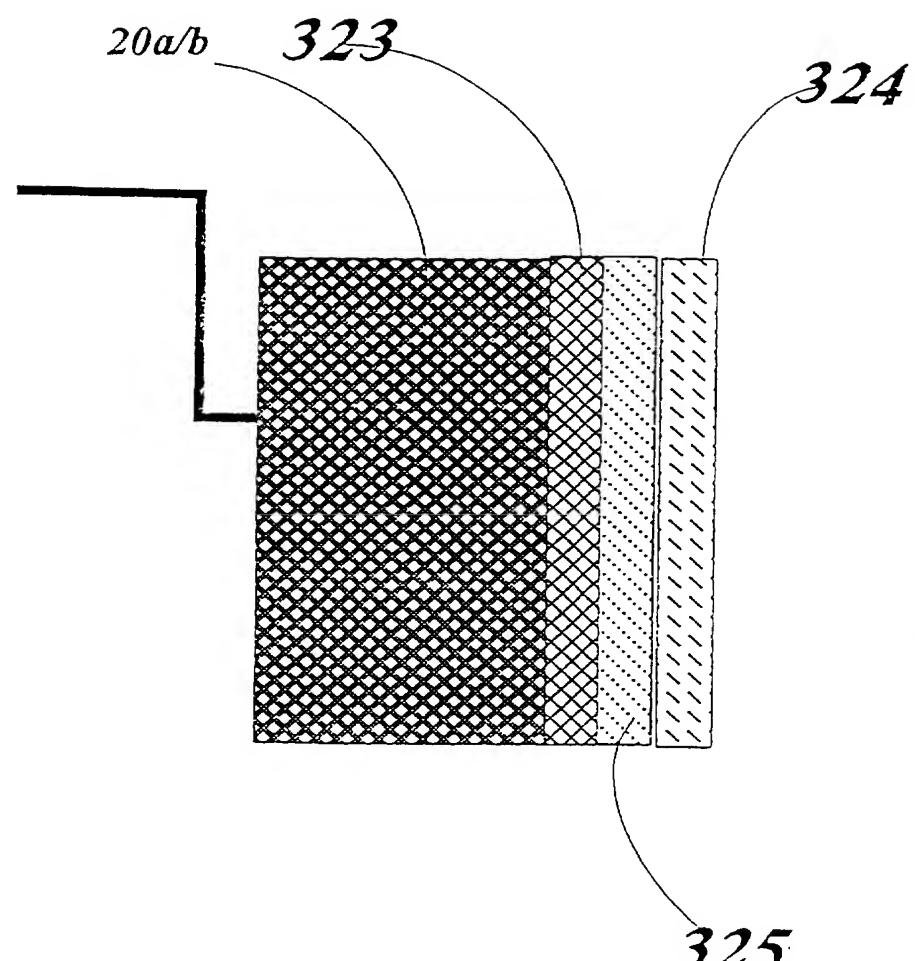


Fig. 9

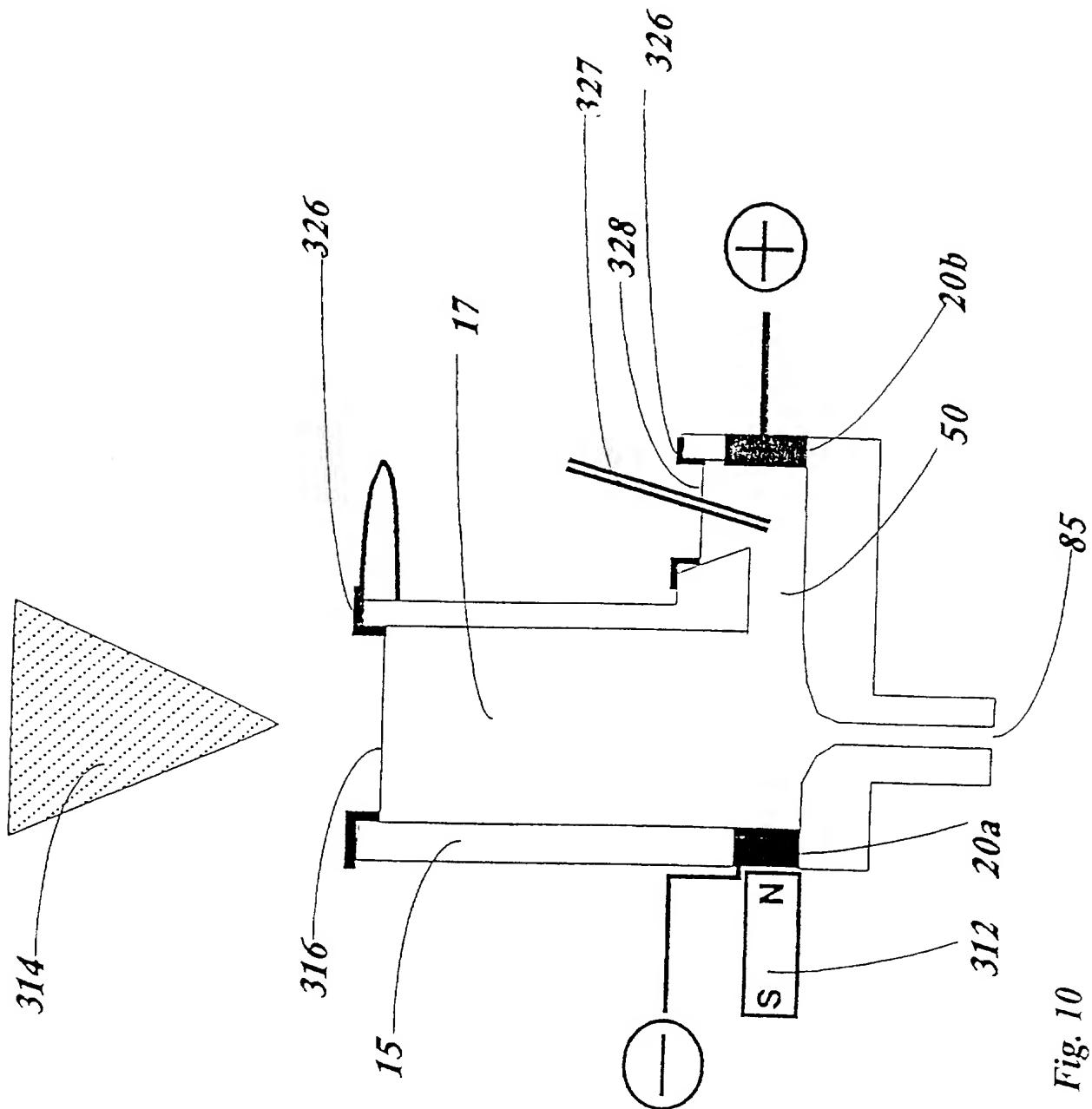


Fig. 10

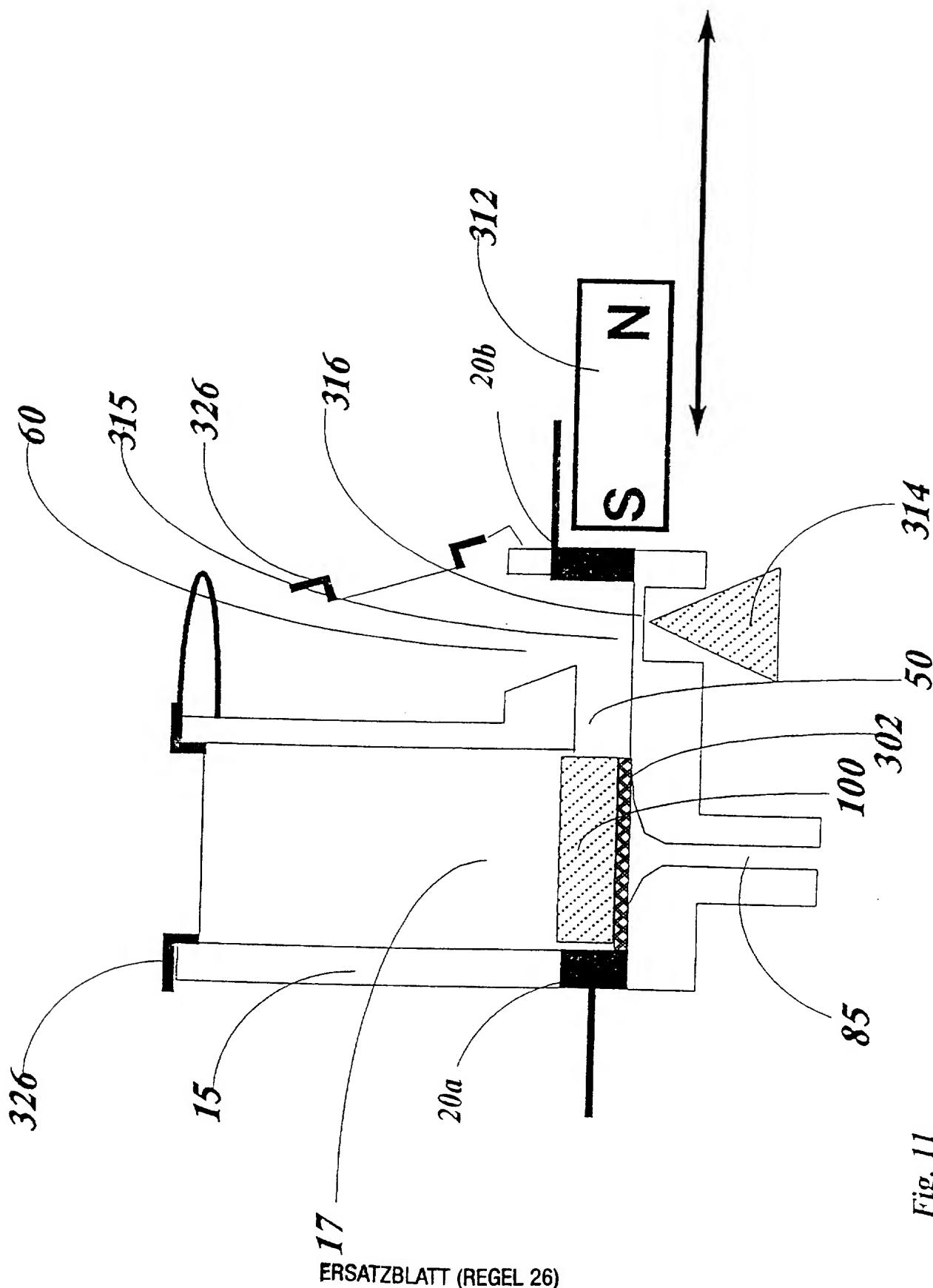


Fig. 11

ERSATZBLATT (REGEL 26)

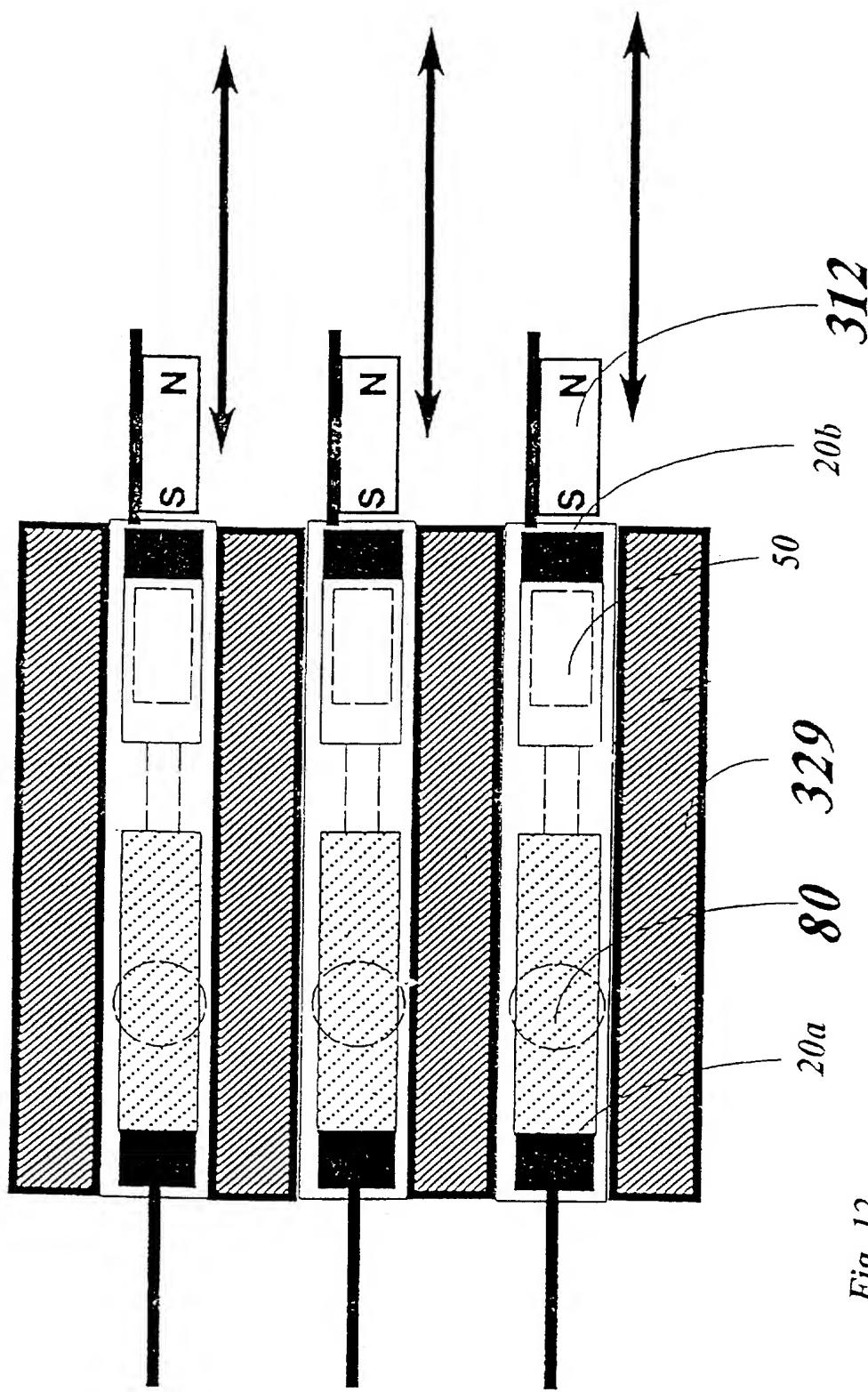


Fig. 12

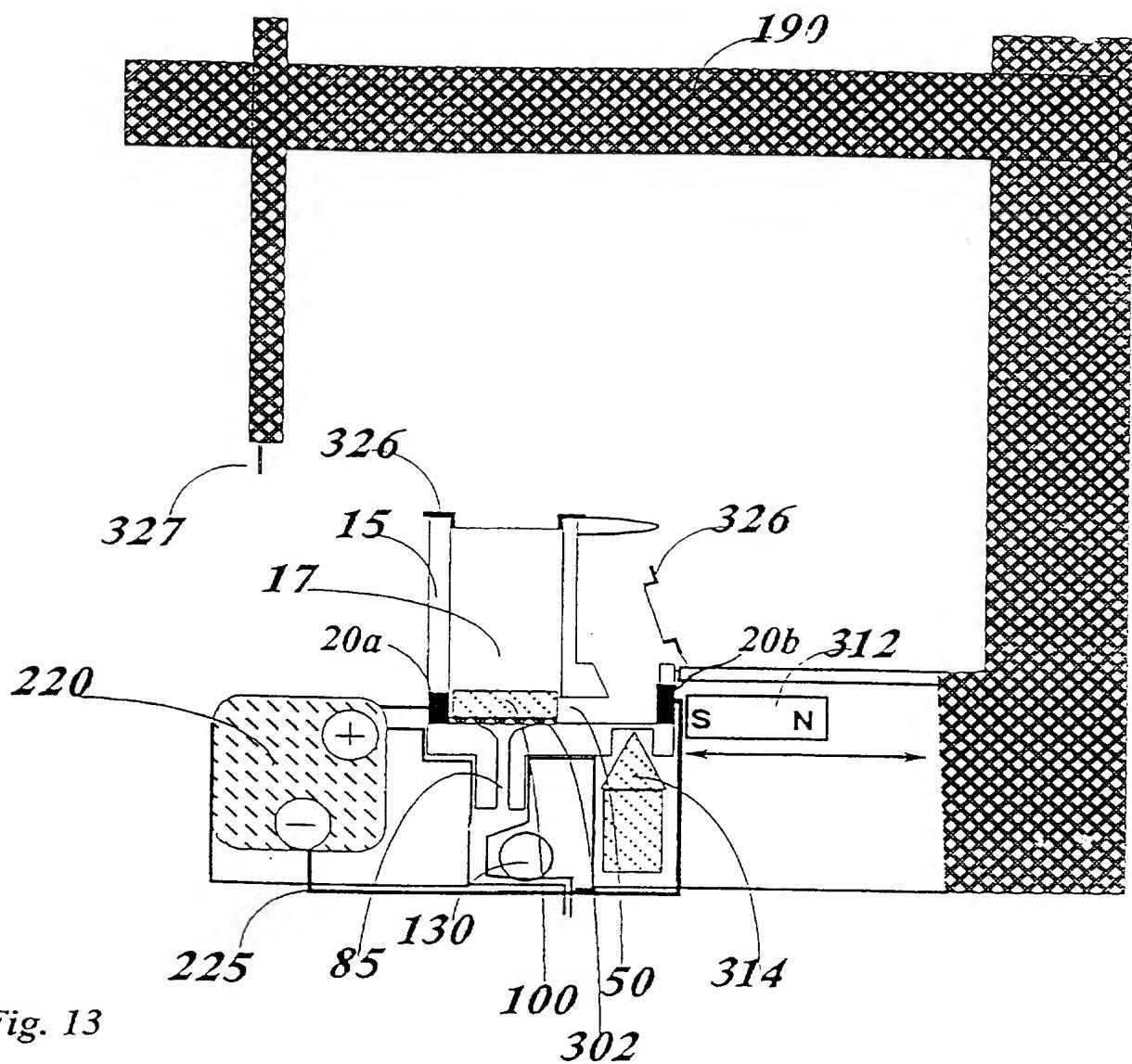


Fig. 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/00517

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 6	C07H1/08	C12Q1/68	C12N15/10 C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07H C12Q C12N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 687 502 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 20 December 1995 see column 9 - column 10; claims; figures 4-6 ---	1,12
A	FR 2 402 716 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 6 April 1979 see page 3, line 16 - line 23; claims; examples ---	1,12
A	US 5 340 449 A (SHUKLA A.K.) 23 August 1994 see the whole document ---	1,12 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 August 1997

Date of mailing of the international search report

27-08-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Day, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/00517

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 41 39 664 A (DIAGEN INSTITÜT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 3 June 1993 cited in the application see claims -----	1,12
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/00517

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 687502 A	20-12-95	DE 4420732 A JP 8009957 A	21-12-95 16-01-96
FR 2402716 A	06-04-79	NONE	
US 5340449 A	23-08-94	NONE	
DE 4139664 A	03-06-93	DE 59205979 D WO 9311218 A WO 9311221 A EP 0616638 A EP 0616639 A JP 7501222 T JP 7501223 T	15-05-96 10-06-93 10-06-93 28-09-94 28-09-94 09-02-95 09-02-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00517

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
IPK 6 C07H1/08 C12Q1/68 C12N15/10 C12M1/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07H C12Q C12N C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 687 502 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 20.Dezember 1995 siehe Spalte 9 - Spalte 10; Ansprüche; Abbildungen 4-6 ---	1,12
A	FR 2 402 716 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 6.April 1979 siehe Seite 3, Zeile 16 - Zeile 23; Ansprüche; Beispiele ---	1,12
A	US 5 340 449 A (SHUKLA A.K.) 23.August 1994 siehe das ganze Dokument ---	1,12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19.August 1997	27-08-1997
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Day, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PC1/DE 97/00517

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 41 39 664 A (DIAGEN INSTITÜT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 3.Juni 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche -----	1,12
1		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00517

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 687502 A	20-12-95	DE 4420732 A JP 8009957 A	21-12-95 16-01-96
FR 2402716 A	06-04-79	KEINE	
US 5340449 A	23-08-94	KEINE	
DE 4139664 A	03-06-93	DE 59205979 D WO 9311218 A WO 9311221 A EP 0616638 A EP 0616639 A JP 7501222 T JP 7501223 T	15-05-96 10-06-93 10-06-93 28-09-94 28-09-94 09-02-95 09-02-95